

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.005.022

# 响应面法优化森吉木霉 M75 菌株 发酵培养条件

张 铭<sup>1</sup>, 宁少华<sup>2</sup>, 高 茜<sup>1</sup>, 谢 宪<sup>1</sup>, 程 元<sup>1</sup>, 梁 军<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与自然保护研究所, 国家林业和草原局森林保护学重点实验室, 北京 100091;

2. 北京市西山试验林场, 北京 100093)

**摘要:** [目的] 利用响应面法优化森吉木霉 M75 菌株的液体发酵培养条件, 使其无菌滤液拮抗松枯梢病原菌松球壳孢菌的抑菌活性得到有效提高, 获得森吉木霉 M75 高效抑菌的发酵培养基配方。[方法] 采用 Plackett-Burman 试验设计、最陡爬坡试验, 结合响应面设计法优化森吉木霉 M75 的发酵培养基, 采用 Design Expert 11.0 软件对试验数据进行处理分析。[结果] 得到了培养基配方中对森吉木霉 M75 发酵滤液抑菌活性影响最显著的 3 个主要因素: 葡萄糖、温度和转速, 同时得到了最佳发酵培养浓度为: 葡萄糖 2.75%, 胰蛋白胍 1.2%, 硫酸锌 0.2%, 马铃薯浸汁 1 000 mL, 温度 31.0 °C、转速 195 r·min<sup>-1</sup>, 接种量 5%, 装液量 180 mL, 发酵培养 5 d。[结论] 获得了在实验室条件下森吉木霉 M75 菌株高效抑菌的发酵培养基配方和培养条件, 为森吉木霉菌株后续的研究提供了有效依据。

**关键词:** 森吉木霉; 发酵培养; 响应面法

**中图分类号:** S763.13

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2022)05-0196-10

松枯梢病 (又名松梢枯病 shoot blight of pine) 是世界范围内针叶树种上分布最广最常见的重要林木枝干病害之一<sup>[1]</sup>。自从我国自 20 世纪 70 年代末报道以来, 松枯梢病已蔓延至黑龙江、吉林、辽宁、陕西、江苏、湖北、福建、安徽、江西、广东和广西等 10 余个省份<sup>[2]</sup>, 严重危害松属 (*Pinus*)、冷杉属 (*Abies*)、落叶松属 (*Larix*)、崖柏属 (*Thuja*)、雪松属 (*Cedrus*)、刺柏属 (*Juniperus*)、云杉属 (*Picea*) 和黄杉属 (*Pseudotsuga*) 约 8 属 60 多种针叶树种<sup>[3]</sup>。前期研究发现的森吉木霉 (*Trichoderma songyi*) M75 菌株的无菌发酵滤液对赤松枯梢病原菌松球壳孢菌 (*Sphaeropsis sapinea*) 具有较好的抑菌活性<sup>[4]</sup>, 如果能继续优化提高森吉木霉 M75 的抑菌活性, 这一菌株在病害防治领域的应用将大有前景。但目前还未见有

关森吉木霉 M75 的发酵优化研究。响应面优化 (Response Surface method) 是最常见的应用于真菌发酵领域的研究方法<sup>[5]</sup>。这种方法比单因素试验和正交分析试验更全面, 利用拟合因素和相应值之间的多元二次函数关系<sup>[6]</sup>, 通过 3D 曲面图和 2D 等高线图直观的展示出各因子之间的交互作用, 而非简单的线性关系<sup>[7]</sup>, 其最大的优势是大大减少了试验次数, 利用合理的理论范围内较少的试验数据得到最优的发酵培养条件, 减轻了发酵优化的工作量<sup>[8]</sup>, 也提高了优化的准确性和合理性<sup>[9]</sup>, 是目前发酵领域应用最多的一种实验设计和统计分析方法<sup>[10]</sup>。本研究通过 Plackett-Burman 试验从众多因素中筛选得到显著影响抑菌活性的关键因子<sup>[11]</sup>, 根据最陡爬坡试验使关键因子的取值逐步逼近响应面的中心点<sup>[12]</sup>, 最后利用响应面分析法中的

收稿日期: 2021-12-15 修回日期: 2021-12-30

基金项目: 国家重点研发计划资助 (2021YFD1400300)

\* 通讯作者: 梁军, 博士, 研究员, 研究方向: 森林保护学; E-mail: liangjun@caf.ac.cn

中心复合设计 (CCD 法) 确定最优的发酵培养基配比<sup>[13]</sup>, 最大程度的提高森吉木霉 M75 无菌发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌活性。本研究通过 PB 试验、最陡爬坡以及响应面分析等多种试验方法, 更全面准确的寻求最佳发酵培养基的配比及培养条件, 进一步提高森吉木霉 M75 的抑菌效能, 使生防菌株在松枯梢病的防治过程中得到更高效的利用, 同时为今后大量获取抑菌活性物质提供了一定的理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

松球壳孢菌 (*S. sapinea*) 由中国林业科学研究院菌种保藏中心提供。森吉木霉 (*T. songyi*) M75 由本实验室分离筛选获得, 现保藏于中国林业微生物菌种保藏管理中心, 保藏编号: CFCC54490。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 森吉木霉 M75 无菌发酵滤液制备** 将保藏的 M75 菌株接种于 PDA 固体培养基上, 28 ℃ 活化 5 d, 用打孔器选取直径 5 mm 菌饼, 接入装有 250 mL PDA 液体培养基的三角瓶中, 180 r·min<sup>-1</sup>、28 ℃ 振荡培养 4 d, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 4 ℃ 离心 10 min, 弃沉淀, 取上清液经 0.45 μm 无菌微孔滤膜过滤,

于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

**1.2.2 森吉木霉 M75 无菌发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌试验方法** 取 1.5 mL 1.2.1 中得到的 M75 无菌发酵滤液, 与加热并冷却至 45~50 ℃ 的 PDA 培养基混合均匀并倾倒平板。待平板凝固后, 在平板中央点接活化后的直径 5 mm 的松球壳孢菌菌饼, 以添加无菌水制备的平板作为对照。于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 5 d, 测量松球壳孢菌的菌落直径。所有处理重复 3 次, 抑菌率计算公式如下:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{松球壳孢菌对照组直径} - \text{松球壳孢菌处理组直径}}{\text{松球壳孢菌对照组直径}} \times 100\%$$

**1.2.3 Plackett-Burman 试验确定显著因素** 利用 Plackett-Burman 设计<sup>[14]</sup>对影响森吉木霉 M75 菌株抑菌活性的 8 个因素进行显著性筛选, 包括葡萄糖 (A)、胰蛋白胨 (B)、硫酸锌 (C)、温度 (D)、转速 (E)、接种量 (F)、装液量 (G) 和培养时间 (H)。各因素分别设置两个水平, 即高水平 (+1) 和低水平 (-1), 各因素水平值见表 1。以森吉木霉 M75 发酵培养后的无菌发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌率作为响应值 (Y), 设计 12 组试验, 每组试验重复处理 3 次, 抑菌率取 3 次平均值。

表 1 Plackett-Burman 试验设计中各因素的水平值  
Table 1 Levels of the variables of Plackett-Burman design

编号 Variable code	因素 Variables	水平 Levels	
		低水平 Low value (-1)	高水平 High value (+1)
A	葡萄糖 (Glucose)	2%	3%
B	胰蛋白胨 (Tryptone)	1%	1.4%
C	硫酸锌 (ZnSO <sub>4</sub> )	0.15%	0.25%
D	温度 (Temperature)	30 ℃	34 ℃
E	转速 (Speed)	180 r/min	200 r/min
F	接种量 (Inoculation amount)	2%	4%
G	装液量 (liquid volume)	160 mL	200 mL
H	培养时间 (Time)	4 d	6 d

注: 表中百分号表示体积百分比

Note: “%” represents the volume percentage

**1.2.4 最陡爬坡试验设计** 在 PB 试验的基础上, 对森吉木霉 M75 无菌发酵滤液抑菌活性有显著影响的 3 个关键因素进行最陡爬坡试验, 使各因素响应值进一步逼近最优区域并确定 CCD 设计的中心

点<sup>[15]</sup>。对所得试验数据进行统计分析确定出拟合方程后, 依据系数的正负和大小确定 3 个显著因素的最陡爬坡, 其中 3 个关键因素对无菌发酵滤液抑菌活性的正负值决定了爬坡方向, 3 个关键因素在方

程中的相应系数的大小决定爬坡步长值<sup>[16]</sup>。赋响应值 (Y) 为森吉木霉 M75 无菌发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌率 (%)。共设计 7 组爬坡试验, 各组重复检测 3 次, 对所得结果取平均值计算抑菌率。

**1.2.5 中心复合设计 (Central Composite Design, CCD)** 根据 PB 试验确定影响抑菌率的关键因素、最陡爬坡试验确定了关键因素取值的中心试验点之后, 利用中心复合设计法 (Central Composite Design, CCD) 建立 3 因素 5 水平的响应面模型<sup>[17]</sup>, 赋响应值 Y 为森吉木霉 M75 无菌发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌率, 共设计 20 组试验, 每组试验重复处理 3 次, 抑菌率取 3 次平均值。利用 Design Expert 11.0 对试验结果进行拟合回归分析, 建立二次回归方程, 通过响应面分析方法拟合出抑菌率的最大响应值, 从而得到使森吉木霉 M75 的无菌发酵滤液达到最大抑菌活性的最优发酵培养基配方及培养条件。

### 1.3 模型验证与数据统计分析

将森吉木霉 M75 分别置于利用响应面模型拟合出的最优发酵培养基中发酵培养, 每组试验重复处理 3 次, 测定优化培养基下的无菌发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌率, 验证试验值与模型的理论值是否相一致, 对模型的可靠性和有效性进行分析和验证<sup>[18]</sup>, 从而得出最优的发酵培养基配比, 并对优化前后森吉木霉 M75 无菌发酵滤液的抑菌率进行比

较。采用 Design Expert 11.0、SPSS 26.0 和 Excel 2010 软件对实验数据进行统计和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 Plackett-Burman 试验筛选显著影响因子

通过 PB 试验设计 (N=12), 对葡萄糖 (A)、胰蛋白胨 (B)、硫酸锌 (C)、温度 (D)、转速 (E)、接种量 (F)、装液量 (G) 和培养时间 (H) 8 个因素进行二水平试验, 试验设计组合及结果见表 2, PB 试验效应评价及显著性分析见表 3。

由结果可知, 在第 11 组试验中, 森吉木霉 M75 发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌效果最好, 抑菌率达到 77.33% (表 2)。8 个因子的显著性排序为温度>葡萄糖>转速>装液量>硫酸锌>胰蛋白胨>接种量>培养时间, 其中温度、葡萄糖、转速的显著性位于前三位, 即温度 (D)>葡萄糖 (A)>转速 (E), 且 P 值均小于 0.05, 说明这 3 个因素为关键因素, 能显著影响森吉木霉 M75 的无菌发酵滤液的抑菌活性, 表明其是构建响应面模型的主要影响因子, 将这 3 个因素作为主要考虑因素进行下一步试验。其中, 在选择二水平范围内, 温度 (D) 对抑菌活性具有负效应, 葡萄糖 (A) 和转速 (E) 具有正效应 (表 3)。

表 2 Plackett-Burman 试验组合及结果

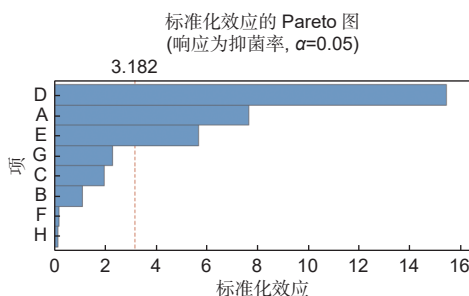
Table 2 Design and corresponding results of Plackett-Burman experiment

试验号 Run No.	因素 Variables								菌落直径 Colony diameter/cm	抑菌率 Inhibition rate/%
	A葡萄糖/%	B胰蛋白胨/%	C硫酸锌/%	D温度/℃	E转速/(r·min <sup>-1</sup> )	F接种量/%	G装液量/mL	H培养时间/d		
1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	3.11 ± 0.10	58.44 ± 0.01
2	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	2.82 ± 0.06	62.35 ± 0.01
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.5 ± 0.05	66.67 ± 0.01
4	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	3.43 ± 0.06	54.27 ± 0.01
5	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	3.09 ± 0.08	58.76 ± 0.01
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	2.12 ± 0.13	71.78 ± 0.02
7	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2.23 ± 0.07	70.31 ± 0.01
8	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	2.88 ± 0.10	61.56 ± 0.01
9	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	2.97 ± 0.20	60.44 ± 0.03
10	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	3.02 ± 0.16	59.78 ± 0.02
11	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1.7 ± 0.13	77.33 ± 0.02
12	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1.78 ± 0.08	74.53 ± 0.02

表 3 Placket-Burman 试验效应评价  
Table 3 Evaluation of placket-Burman test effect

因素 Variables	水平 Levels		效应 Estimate	T值 t-Value	P值 p-Value	显著性排序 Significance order
	低水平 Low value (-1)	高水平 High value (+1)				
A: 葡萄糖 Glucose	2	3	5.768	7.67	0.005	2
B: 胰蛋白胨 Tryptone	1	1.4	-0.835	-1.11	0.348	6
C: 硫酸锌 ZnSO <sub>4</sub>	0.15	0.25	1.485	1.98	0.143	5
D: 温度 Temperature	30	34	-11.622	-15.46	0.001	1
E: 转速 Rotating speed	180	200	4.272	5.68	0.011	3
F: 接种量 Inoculation amount	2	4	-0.142	-0.19	0.863	7
G: 装液量 Liquid loading	160	200	-1.725	-2.30	0.105	4
H: 培养时间 Incubation time	4	6	0.112	0.15	0.891	8

标准化效应的帕累托图 (图 1) 显示从最大效应到最小效应的标准化效应的绝对值。在 Pareto 图中, 温度 (D)、葡萄糖 (A) 转速 (E) 跨越了  $t = 3.182$  的参考线, 表示这 3 个因素在  $\alpha = 0.05$  水平上具有显著性, Pareto 图结果与 PB 试验效应评价中的显著性结果相一致。对 PB 试验结果进行拟合方程回归分析, 得到多元一次方程:  $Y = 64.686 + 2.884 A - 0.417 B + 0.743 C - 5.811 D + 2.136 E - 0.071 F - 0.862 G + 0.056 H$ 。该方程的决定系数 ( $R^2$ ) = 0.9913, 表明该方程拟合良好。由方程可知, 温度 (D) 的系数为负, 提示温度的取值对抑菌率的影响效应为负, 应逐步降低温度的取值; 而葡萄糖 (A) 和转速 (E) 的系数皆为正值, 说明增大这两个关键变量的取值对抑菌率的影响效应为正, 应逐步提高葡萄糖的添加量, 并相应的提高转速。



注: A: 葡萄糖, B: 胰蛋白胨, C: 硫酸锌, D: 温度, E: 转速, F: 接种量, G: 装液量, H: 培养时间

Note: A: Glucose; B: Tryptone; C: ZnSO<sub>4</sub>; D: Temperature; E: Rotating speed; F: Inoculation amount; G: Liquid loading; H: Incubation time

图 1 标准化效应的帕累托图

Fig. 1 Pareto plot of standardized effects

## 2.2 最陡爬坡试验结果

根据 PB 试验中得到多元一次方程, 其系数值决定了最陡爬坡试验中的爬坡方向和爬坡变化的步长值。其中葡萄糖 (A) 和转速 (E) 系数为正, 说明增大这两个关键变量的取值时对响应值抑菌率的影响为正效应, 应增大这两个关键变量的取值, 而温度 (D) 的系数为负, 提示温度的取值对响应值抑菌率的影响效应为负, 应逐步降低温度。其他非显著性因素的取值保持不变。共设计 7 组最陡爬坡试验 (表 4), 第 4 组中森吉木霉 M75 无菌发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌率最高, 即当葡萄糖 (A) 为 2.75%, 温度 (D) 为 31 °C, 转速 (E) 为 195 r·min<sup>-1</sup> 时, 抑菌活性达到最优, 即在中心试验点附近, 以上述条件作为 CCD 中心点进行响应面试验。

## 2.3 中心组合 CCD 设计

以 PB 试验中筛选出的 3 个关键因素和最陡爬坡试验确定的最优中心点进行森吉木霉 M75 无菌发酵滤液的中心复合试验设计 (Central Composite Design, CCD)。其中, 将 3 个关键因素设置为 5 个水平梯度 (-1.68、-1、0、1、1.68), 试验因素及水平如表 5 所示, 试验设计及结果如表 6 所示。对表 6 中的试验结果进行二次回归, 得到的拟合方程如下:

$$Y = 82.02 + 3.12A + 2.23D - 2.09E - 1.59AD + 2.56 AE + 1.95DE - 3.76 A^2 - 8.33 D^2 - 2.95 E^2$$

其中 Y 为森吉木霉 M75 无菌发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌率, A 为葡萄糖, D 为温度, E 为转速。

对拟合的回归方程进行方差分析, 结果如表 7

表 4 最陡爬坡试验设计及结果

Table 4 Design and corresponding results of the steepest ascent experiment

试验号 Run No.	因素 Variables			抑菌率/% Inhibition rate
	A葡萄糖/% Glucose	D温度/℃ Temperature	E转速/(r·min <sup>-1</sup> ) Rotating speed	
1	2.00	34	180	57.11 ± 0.34
2	2.25	33	185	61.42 ± 0.15
3	2.50	32	190	74.89 ± 0.12
4	2.75	31	195	77.78 ± 0.08
5	3.00	30	200	76.09 ± 0.13
6	3.25	29	205	73.73 ± 0.23
7	3.50	28	210	71.78 ± 0.16

表 5 中心组合 ( CCD ) 试验变量及水平

Table 5 Variables and levels for central composite design

因素 Variables	水平 Levels				
	-1.68	-1	0	1	1.68
A: 葡萄糖 Glucose	1.90	2.25	2.75	3.25	3.59
D: 温度 Temperature	27.6	29	31	33	34.4
E: 转速 Rotating speed	170	180	195	210	220

表 6 中心组合 ( CCD ) 试验设计及结果

Table 6 Design and results of central composite design ( CCD )

试验号 Run No.	因素 Variables			抑菌率 Inhibition rate/%	
	A葡萄糖 Glucose	D温度 Temperature	E转速 Speed	试验值 Experimental	预测值 Predicted
1	-1	1	-1	68.76	66.21
2	1	-1	-1	68.42	66.77
3	0	0	0	82.71	82.02
4	0	0	1.68	79.52	77.21
5	0	0	0	82.71	82.02
6	-1	-1	-1	62.85	62.45
7	0	0	0	82.71	82.02
8	0	0	-1.68	66.78	70.16
9	-1	-1	1	56.68	57.62
10	0	-1.68	0	55.49	54.71
11	-1.68	0	0	65.84	66.13
12	1	1	-1	65.85	64.15
13	0	1.68	0	60.38	62.23
14	-1	1	1	68.28	69.18
15	0	0	0	78.75	82.02
16	1	1	1	77.72	77.36
17	0	0	0	82.71	82.02
18	1.68	0	0	75.86	76.64
19	0	0	0	82.71	82.02
20	1	-1	1	70.38	72.17

表 7 中心组合试验设计拟合模型的方差分析

Table 7 Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic model of central composite experimental design

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方差 Mean Square	F值 F-value	P值 P-value
模型 Model	1 538.95	9	170.99	32.93	<0.000 1
A	133.20	1	133.20	25.65	0.000 5
D	68.13	1	68.13	13.12	0.004 7
E	59.92	1	59.92	11.54	0.006 8
A*D	20.29	1	20.29	3.91	0.076 3
A*E	52.43	1	52.43	10.10	0.009 9
D*E	30.42	1	30.42	5.86	0.036 0
A <sup>2</sup>	203.67	1	203.67	39.22	<0.000 1
D <sup>2</sup>	998.90	1	998.90	192.37	<0.000 1
E <sup>2</sup>	125.09	1	125.09	24.09	0.000 6
Residual	51.93	10	5.19		
Lack of Fit	38.86	5	7.77	2.97	0.128 4
Pure Error	13.07	5	2.61		
Cor Total	1 590.88	19			

注: A为葡萄糖, D为温度, E为转速。\*\*表示在 $p < 0.01$ 显著, \*表示在 $p < 0.05$ 显著, N表示在 $p < 0.05$ 不显著; 决定系数 $R^2 = 0.967 4$ , 调整后的决定系数Adj  $R^2 = 0.938 0$ , 预测 $R^2 = 0.800 5$ , 变异系数C.V.=3.18, 信噪比(Adeq Precision) = 16.945 4。

Note: A: Glucose, D: Temperature, E: Speed. \*\* means significant at  $p < 0.01$ , \* means significant at  $p < 0.05$  and N means not significant at  $p < 0.05$ .  $R^2 = 0.967 4$ , Adj  $R^2 = 0.938 0$ , Predicted  $R^2 = 0.800 5$ , C.V. = 3.18, Adeq Precision = 16.945 4

所示, 该回归方程模型的  $F$  值为 32.93,  $P < 0.000 1$ , 表明模型极显著, 而失拟项 Lack of Fit 反映试验数据与模型不相符的情况, 失拟项  $F$  值为 2.97,  $P$  值为 0.128 4  $> 0.05$ , 表示失拟项是不显著的, 这表示方程拟合较好, 模型稳定且选择正确。模型决定系数  $R^2 = 0.967 4$ , 说明整体情况的 96.74% 可以用此模型来解释, 调整后的相关性决定系数 Adj  $R^2 = 0.938 0$ , 预测  $R^2 = 0.800 5$ , 进一步表明所拟合的模型具有较高的稳定性, 对实际情况拟合程度良好, 可以对森吉木霉无菌发酵滤液的抑菌活性的变化提供一个合适的模型, 也说明各试验因素对抑菌率的影响并不是呈现简单的线性规律, 而是二次函数关系。

## 2.4 中心组合 CCD 结果分析

对拟合的回归模型, 使用 Design Expert 11.0 软件绘制响应的 3D 响应面分析图及对应的 2D 等

高线图, 来探究葡萄糖、温度与转速之间的相互关系对抑菌活性的影响及在得到最高响应值 (即最大抑菌率时), 3 个因素的取值 (图 2~4)。2D 等高线图是回归方程的图形表达形式, 即用图形语言对各因素的交互关系及最优化条件下的变量进行相关解释, 可直观的展示出两因素之间的相互作用及最大响应值对应的各因素的最佳水平。一般情况下 3D 曲面越明显弯曲, 2D 等高线图越陡, 则说明两因素之间关系越显著, 反之, 若 3D 曲面不明显, 2D 等高线图越接近于圆形, 则说明两因素之间关系不显著。

2.4.1 葡萄糖与温度的交互作用 如图 2 所示, 在转速 (E) 处于零水平时, 葡萄糖 (A) 与温度 (D) 交互的 2D 等高线图曲度较缓, 呈近似圆形的椭圆形, 表示葡萄糖与温度交互作用不显著。这与方差分析表 7 中的结果相一致 ( $P_{A*D} = 0.076 3 >$

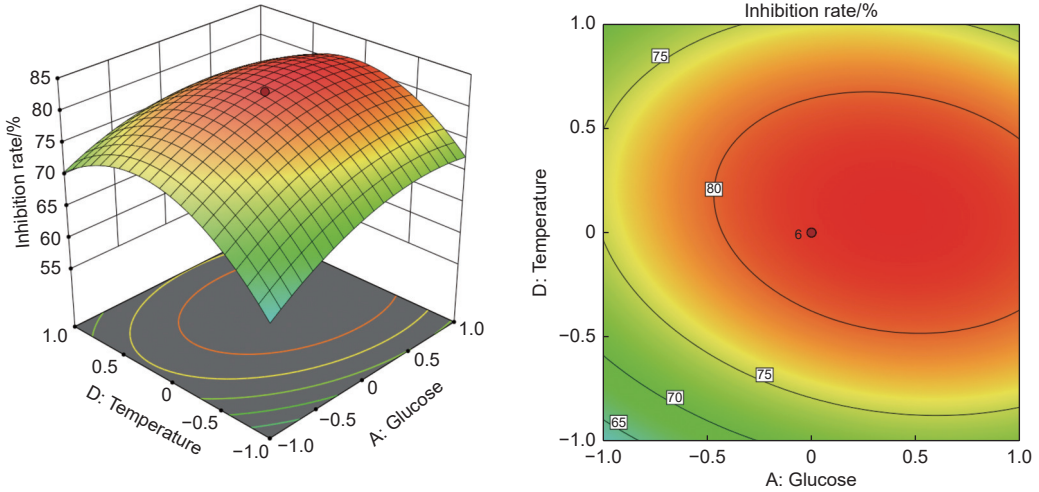


图 2 葡萄糖和温度交互作用效应影响森吉木霉 M75 抑菌活性的 3D 响应曲面图和 2D 等高线

Fig. 2 3D response surface plot and 2D contour plot of the interaction effect of glucose and temperature on the antibacterial activity of *T. songyi* M75

0.05)。

2.4.2 葡萄糖与转速的交互作用 如图 3 所示, 在温度 (D) 处于零水平时, 葡萄糖 (A) 与转速

(E) 交互的 2D 等高线图曲度较陡, 呈明显的椭圆形, 表示葡萄糖与温度交互作用显著, 与方差分析表 7 中的结果相一致 ( $P_{A^*E} = 0.009\ 9 < 0.05$ )。

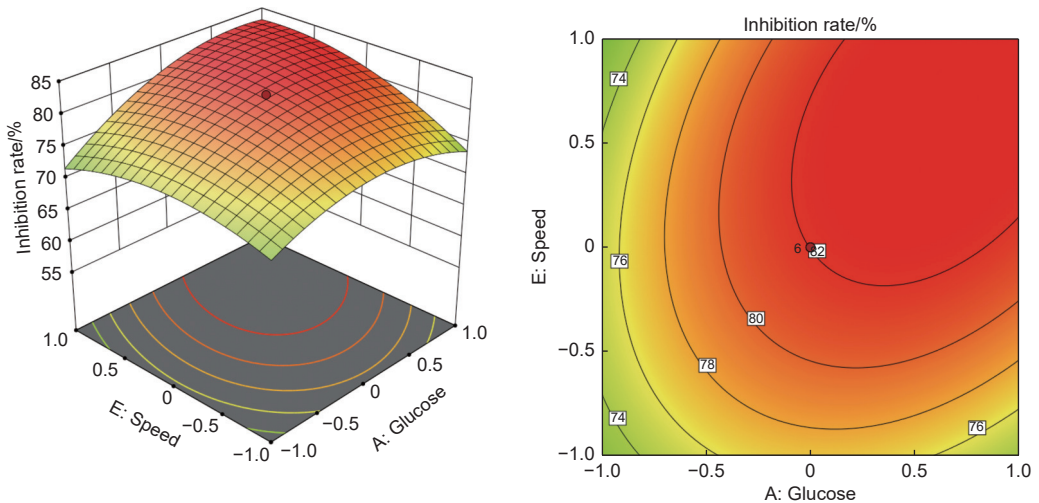


图 3 葡萄糖和转速交互作用效应影响森吉木霉 M75 抑菌活性的 3D 响应曲面图和 2D 等高线

Fig. 3 3D response surface plot and 2D contour plot of the interaction effect of glucose and rotating speed on the antibacterial activity of *T. songyi* M75

2.4.3 温度与转速的交互作用 如图 4 所示, 在葡萄糖 (A) 处于零水平时, 温度 (D) 与转速 (E) 交互的 2D 等高线图曲度较陡, 呈明显的椭圆形, 表示温度与转速二者之间的存在显著的交互作用效果, 与表 7 中的方差检验结果一致 ( $P_{D^*E} = 0.036\ 0 < 0.05$ )。

### 2.5 模型验证分析

对响应面优化模型及结果可靠性进行 3 次重复

试验验证, 抑制率均值为 81.50%, 与模型预测的理论值十分接近, 说明该模型的设计具有可靠性。而优化前的抑菌率只有 74.47%, 优化后森吉木霉 M75 的无菌发酵滤液的抑菌率提高了 9.44%, 松球壳孢菌在带菌平板上的菌落直径只有 1.45 cm, 比优化前缩减了 27.5%, 菌落的生长受到更明显的抑制 (图 5)。这也证明了利用中心复合设计法所得到的二次回归方程模型的有效性, 证明了利用响

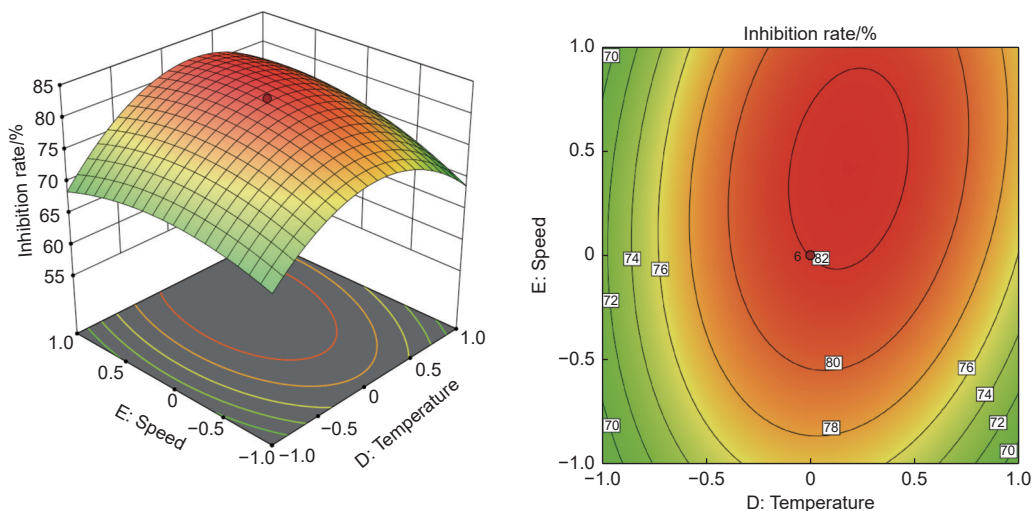
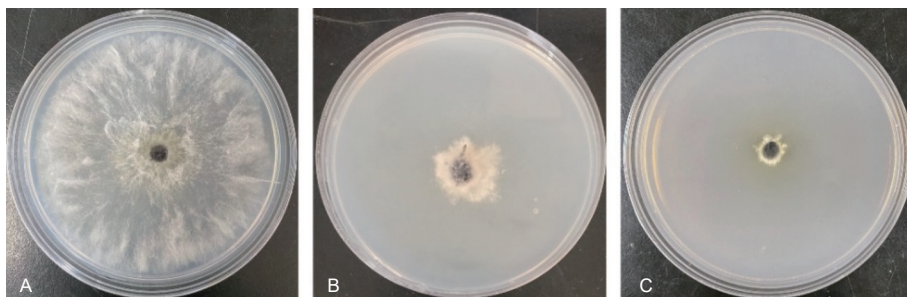


图 4 温度和转速交互作用效应影响森吉木霉 M75 抑菌活性的 3D 响应曲面图和 2D 等高线

Fig. 4 3D response surface plot and 2D contour plot of the interaction effect of temperature and rotating speed on the antibacterial activity of *T. songyi* M75



注: A 为对照, B 为优化前的抑菌效果, C 为优化后的抑菌效果

Note: A: CK; B: Before optimization; C: After optimization

图 5 森吉木霉 M75 无菌发酵滤液对松枯梢病原菌的抑菌效果

Fig. 5 Inhibition activities of sterile culture filtrates produced by *T. songyi* M75 against *S. sapinea*

应面法优化森吉木霉 M75 的发酵培养基和发酵条件是准确、有效且可行的。

### 3 讨论

培养条件的优化是微生物实现大批量工业化生产必不可少的环节之一, 而不同的培养条件及培养基配比对微生物代谢产物的产量密切相关<sup>[19]</sup>。利用响应面分析法这种优化试验条件的科学统计方法, 可以准确的利用较少的试验数据模拟出使目标对象达到最优值时的各因素的条件<sup>[20]</sup>, 可以有效提高优化效率与试验进程<sup>[21]</sup>。通过改善和优化森吉木霉 M75 的初始培养基配比及培养条件等, 使它的无菌发酵滤液对松球壳孢菌的抑菌率达到了 81.50%, 大大提高了抑菌活性, 说明利用响应面分析法优化森吉木霉产抑菌活性物质的发酵条件是有效可行

的。本研究利用 PB 试验筛选出关键组分, 使关键因素的取值逐步逼近中心点, 最后利用 CCD 中心复合设计找到最优点, 这些因素之间并不是相互独立影响抑菌活性, 他们之间的交互作用可能会使抑菌活性有所增减<sup>[22]</sup>。中心复合设计结果表明, 在葡萄糖、温度与转速 3 个关键因素之间, 葡萄糖与温度之间的交互作用不显著, 说明单纯增加葡萄糖的含量, 提高温度, 不提升转速, 液体培养基中的充足的糖分和氧气得不到有效利用, 就限制了森吉木霉 M75 产抑菌物质的产量, 影响了抑菌活性。而葡萄糖与转速两关键因子之间的交互作用显著, 温度与转速两关键因子之间的交互作用也是显著的, 表明在合适的转速水平上, 液体培养基中的糖分和氧气能被森吉木霉 M75 菌株得到充分的分解和利用, 提高了抑菌物质的产量, 从而使此时的无菌发



酵滤液对松球壳孢菌的抑制效果达到最优水平。本研究寻求到的适合森吉木霉 M75 发酵优化的培养基配比及培养条件, 为森吉木霉 M75 菌株作为生防菌株, 进行后续的开发利用提供了理论基础, 为其生防菌剂的开发提供了理论支撑。

## 4 结 论

在实验室条件下获得一株对赤松枯梢病原菌松球壳孢菌具有显著拮抗作用的森吉木霉菌株 M75, 通过响应面法明确其最优抑菌活性的发酵培养条件为: 葡萄糖 2.75%, 胰蛋白胨 1.2%, 硫酸锌 0.2%, 马铃薯浸汁 1 000 mL, 温度 31.0 °C、转速 195 r·min<sup>-1</sup>, 接种量 5%, 装液量 180 mL, 发酵培养 5 d。优化后无菌滤液对赤松枯梢病原菌的抑制率达到 81.50%, 比优化前提高了约 10%, 病原菌菌落扩展直径从优化前的 2.0 cm 缩减至为 1.45 cm, 比优化前降低了 27.5%, 抑菌效果得到了大幅提高。

## 参 考 文 献:

- [1] 叶建仁, 贺伟. 林木病理学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2011: 224-227.
- [2] 唐旭. 松枯梢病拮抗细菌的筛选及其抗病机制初探[D]. 南京: 南京林业大学, 2017.
- [3] 满晓国. 松树枯梢病的发生原因及防治技术[J]. 农村实用科技信息, 2014 (1): 30.
- [4] 张铭, 谢宪, 梁军, 等. 赤松枯梢病生防真菌M75的筛选和鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2022, 50 (4): 78-82.
- [5] Zhong K, Wang Q. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 19-25.
- [6] 张广臣, 雷虹, 何欣, 等. 微生物发酵培养基优化中的现代数学统计学方法[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36 (5): 110-113.
- [7] Lee S, Bae H, Kim N, et al. Optimization of growth conditions of *Lentinus edodes* mycelium on corn processing waste using response surface analysis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(2): 161-163.
- [8] 郭才南, 安佰义, 韩耀灏, 等. 应用响应面法优化提取白檀果实花色苷工艺[J]. 东北林业大学学报, 2020, 48 (7): 98-102.
- [9] Priyadarshini S D, Bakthavatsalam A K. Optimization of phenol degradation by the microalga *Chlorella pyrenoidosa* using

- Plackett-Burman design and response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2016, 207: 150-156.
- [10] Chen Q H, He G Q, Ali M. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2002, 30(5): 667-672.
- [11] 李鹏, 陈秀珍, 庄文颖. 高产纤维素酶的拟康宁木霉菌株8985固态发酵条件优化[J]. 菌物学报, 2021, 40 (4): 743-758.
- [12] 卢超, 陈景鲜, 王国霞, 等. 枯草芽孢杆菌L07产中性蛋白酶发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46 (16): 148-153.
- [13] Sharma S, Malik A, Satya S. Application of response surface methodology (RSM) for optimization of nutrient supplementation for Cr (VI) removal by *Aspergillus lentulus* AML05[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 164(2-3): 1198-1204.
- [14] Soliman N A, Berekaa M M, Abdel-Fattah Y R. Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett-Burman experimental design to evaluate culture requirements.[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2005, 69(3): 259-267.
- [15] Chan L, Bai J, Cai Z, et al. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 93(1): 27-34.
- [16] 李晓艳, 于爽, 窦少华, 等. 植物乳杆菌CLP0279产低温超氧化物歧化酶发酵条件的优化[J]. 微生物学通报, 2016, 43 (10): 2314-2320.
- [17] 屈海峰, 白殿国, 于占春, 等. 中心组合响应面优化里氏木霉B4菌产纤维素酶培养基组成研究[J]. 化工科技, 2016, 24 (6): 29-33.
- [18] Thys R C, Guzzon S O, Cladera-Olivera F, et al. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(1): 67-73.
- [19] 张昊月, 郭正彦, 吕志堂, 等. 应用响应面法优化发酵培养基提高达托霉素产量[J]. 微生物学通报, 2021, 48 (01): 113-122.
- [20] 周喻, 吴文惠, 苏同伟, 等. 响应面法优化海洋镰刀菌产生HMG-CoA还原酶抑制剂的培养条件[J]. 微生物学通报, 2014, 41 (8): 1516-1524.
- [21] Betiku E, Taiwo A E. Modeling and optimization of bioethanol production from breadfruit starch hydrolyzate vis-à-vis response surface methodology and artificial neural network[J]. Renewable Energy, 2015, 74: 87-94.
- [22] 刘小杰, 何国庆, 陈启和. 康氏木霉 ZJ5 纤维素酶发酵培养基的优化[J]. 浙江大学学报:工学版, 2003, 37 (5): 623-628.

# Optimization of Fermentation Conditions of *Trichoderma songyi* M75 Strain by Response Surface Methodology

ZHANG Ming<sup>1</sup>, NING Shao-hua<sup>2</sup>, GAO Qian<sup>1</sup>, XIE Xian<sup>1</sup>, CHENG Yuan<sup>1</sup>, LIANG Jun<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Nature Protection, Chinese Academy of Forest, Key Laboratory of Forest Protection of National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China;  
2. Beijing Xishan Experiment Forest Unit, Beijing 100093, China)

**Abstract:** [Objective] To improve the antibacterial activity of its sterile filtrate against the pathogen of pine shoot blight and obtain the high-efficiency antibacterial fermentation medium formula of *Trichoderma songyi* M75, response surface method was used to optimize the liquid fermentation culture conditions of *T. songyi* M75. [Method] Plackett-Burman experiment, the steepest ascent method, and response surface method were used to optimize the fermentation medium of *T. songyi* M75, and the experiment data were analyzed using Design Expert 11.0. [Result] The three main influential factors were glucose, temperature and speed and the optimal fermentation culture concentrations conditions were: glucose 2.75%, tryptone 1.2%, zinc sulfate 0.2%, potato juice 1000 mL, temperature 31.0 °C, rotation speed 195 r·min<sup>-1</sup>, inoculation volume 5%, liquid volume 180 mL, fermentation culture 5 d. [Conclusion] This study greatly improves the antibacterial activity and obtains the optimal culture conditions, which provides an effective basis for the follow-up study of *T. songyi* strains.

**Keywords:** *Trichoderma songyi*; culture conditions; response surface methodology

(责任编辑: 崔 贝)